

浙江省林学会竹类专业委员会
三届四次学术研讨会

论 文 集

主办单位：浙江省林学会竹类专业委员会

承办单位：浙江省林业科学研究院

龙泉市林业局

协办单位：浙江省竹类研究重点实验室

安吉竹业省级区域科技创新服务中心

浙江省竹产业科技创新服务平台

浙江·龙泉

2009 年 9 月

目 录

第一部分 竹林培育	1
花吊丝竹组培快繁育苗技术研究	张 玮 谢锦忠 黄树燕等 2
毛竹抗逆锌指蛋白基因 cDNA 克隆与序列分析	刘志伟 张智俊 黄业伟 9
Study on organ-pesticide residue in shoot of runner and shoot-used bamboo	郭子武 陈双林 潇江华 16
地面覆盖对毛竹生长影响的初步研究	王 波 汪奎宏 李 琴 等 21
毛竹增产剂竹腔施肥效果初步分析	丁笑章 朱志建 27
NaCl 胁迫对毛竹实生苗生理指标的影响	黄业伟 吴妙丹 杨 丽 30
嵊州市毛竹笋用林雪灾后恢复生产技术的探讨	何德汀 钱小龙 钱 帅 36
四季竹丰产栽培技术试验	吴柏林 李建华 虞敏之 42
冰雪冻害竹林恢复重建技术和对策	胡卫滨 李军武 芦志能等 47
湖州市竹子害虫名录初报	朱志建 屠永海 叶维贤等 50
华丝竹的生物学特性与竹笋特色加工	潘心禾 季赛娟 何盛林 64
无公害竹笋高效经营中的质量技术管理	施廷喜 楼枝春 6 7
乌哺鸡竹新变型	张培新 赖广辉 73
松阳县引种栽培合江方竹试验初报	潘永柱 74
紫竹开花生物学特性观察及花粉生活力的测定	李晓芬 林新春 时 燕等 77
野生石竹丰产林改造技术	刘建灵 国 鸣 李苏珍 83
紫竹四种变异类型的出笋成竹规律研究	杨 浩 何钧潮 张有珍等 86
利用早期笋培育毛竹大径材试验初报	胡金根 唐隆星 毛云飞 92
毛竹采伐年龄对竹林丰产影响的调查分析	周文伟 华锡奇 梁一品 96
麻竹笋用林施肥效应研究	郭岩辉 顾小平 郑仁红等 104
毛竹林土壤酶活性变化的海拔效应研究	陈双林 郭子武 杨清平 113
贮藏处理对毛竹种子活力的影响	李 楠 金群英 彭华正 120
第二部分 竹子加工与利用	126
新型复合竹地板热压工艺研究	李 琴 张 建 汪奎宏等 127
竹叶中总黄酮的提取工艺及应用研究	王志坤 林新春 李 妃 132
不同炭化温度的竹炭对重金属离子吸附性能研究	张文标 钱新标 马灵飞 139

微波消解 ICP-MS 法测定笋制品中的多种元素·····	陈惠云	张玲菊	孙志栋	147
阻燃型竹材刨花板生产工艺及性能研究·····	袁少飞	张 建	李 琴	152
三种大径丛生竹的板材利用研究·····	高珊珊	郑仁红	郭岩辉等	159
无机盐添加剂对竹炭燃烧特性的影响分析·····	庄晓伟	陈顺伟	潘 炘等	166
制竹 Lyocell 纤维的竹浆选择和纯化与溶解工艺研究·····	蒋应梯	许 炯		174
竹材表界面的性能特征及发展现状·····	袁少飞	李 琴	汪奎宏	181
箬叶挥发性香味成分分析·····	潘 炘	庄晓伟	陈顺伟	186
竹材防霉防腐的研究现状及开发方向·····	赵 鹤	李 琴	张 建	19 0
可降解生物基复合材料的研究现状与发展趋势·····	逯 柳	李 琴		197
我国竹材染色研究进展·····	薄巧庆	李 琴	袁少飞等	202
第三部分 社会经济、政策与思考·····				207
浙江省竹业发展情况·····	浙江省竹产业协会			20 8
湖州市竹产业发展现状及转型升级的对策研究·····	杨 健	朱志建	袁晓亮	214
竹产业的现状、作用和发展建议·····	董敦义	李雪涛	吕玉龙	220
临 安 竹 产 业 发 展 对 策 ·····	王丽臻	何钧潮	祝 霞	224
莲都区竹产业发展现状和对策·····	李苏珍	王武军	周文春	228
浙江省安吉县竹产业发展分析·····	魏 彬	杨校生	吴丹丹	232
临安竹产业培育现状与发展对策·····	胡国良	张有珍	周菊敏	240
长兴县竹产业现状与发展对策·····	刘 政	沈 泉	叶国成	244
做好协会工作，促进产业发展·····	董敦义	胡可易		247
德清县笋竹产业现状与发展展望·····	徐柏忠	白洪青	石 坚等	2 51
“中国竹乡”竹产业考察报告·····	张培新			255

第一部分 竹林培育

花吊丝竹组培快繁育苗技术研究

张玮¹ 谢锦忠^{1*} 黄树燕² 李树忠² 吴继林³

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳, 311400; 2. 永安林业股份有限公司种苗中心, 福建, 永安, 366000; 3. 永安市林业局, 福建, 永安, 366000)

摘要: 通过外植体选取、植物激素、添加物、培养方式等因子对花吊丝竹进行了组培快繁技术研究。结果表明: 花吊丝竹丛芽诱导的成功与否与外植体的采集部位、采集时间等相关, 外植体的较好的采集季节为5-6月, 最佳部位为有枝箨包裹的半木质化枝条中上部节段。以3/4MS+BA4mg/L+KT1.0+cw100ml/L培养基进行诱导, 经过多次继代可诱导出丛芽。花吊丝竹丛芽增殖阶段的相对较适宜培养基: 3/4MS+BA2.0mg/L+KT1.0mg/L+CW100ml/L, 采用液体培养基可以有效解决培养中丛芽褐化以及叶片黄化的问题; 生根阶段采用二次生根法, 先对丛芽进行同步化处理, 并在第二次生根过程中采用1/5MS+IBA8 mg/L +NAA4.5 mg/L +KT0.1 mg/L培养基可获得相对较好的生根率; 花吊丝竹生根苗在泥炭土与细河沙(1:3)的基质中移栽成活率达到90%以上。

关键词: 花吊丝竹; 组织培养; 快繁; 技术

Study on Rapid Propagation Technology Of *Dendrocalamus minor var. amoenus*

ZHANG Wei¹ HUANG Shu-yan² XIE Jin-zhong^{1*} LI Shu-zhong² WU Ji-lin³

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China; 2. Yong'an Forestry Co., Ltd, Yong'an, 366000, Fujian, China; 3. Forestry Bureau of Yong'an City, Yong'an, 366000, Fujian, China)

Abstract: The rapid propagation technology of *Dendrocalamus minor var. amoenus* were studied by investigating the effects of the factors such as selection of explant, phytohormone, additive, culture method etc. The results showed that: The best month for explant collection of *Dendrocalamus minor var. amoenus* is May and June. The best position for explant collection is middle-upper part knot of semi-lignification branch. The clump shoot could be induced in medium with 3/4MS+BA4mg/L+KT1.0+cw100ml/L. Optimum medium for subculture of *Dendrocalamus minor var. amoenus* was 3/4MS+BA2.0mg/L+KT1.0mg/L+CW100ml/L. Lique medium was beneficial for improvement growth condition and proliferation rate of clump shoot. Medium 1/5MS+IBA8mg/l+NAA4.5mg/l + KT0.1mg/l was relative suitable rooting medium for *Dendrocalamus minor var. amoenus*, with the rooting method of synchronized treatment first and then rooting. Generally, the survival rate of seedlings could be more than 90% in substrate of peat soil: fine river sand=1:3.

Key words: *Dendrocalamus minor var. amoenus* Rapid Propagation Tissue culture Technology

花吊丝竹(*Dendrocalamus minor var. amoenus*)为牡竹属吊丝竹的变种, 丛生竹, 竹秆淡黄色, 有深绿色纵条纹, 顶梢长而下垂, 如钩丝, 形态优美, 长期被人们用作观赏竹类种植。花吊丝竹用途广泛、适应性强、产笋量高、笋味鲜美细嫩、营养丰富, 作为笋用竹产业和园林绿化, 在南方具有广阔的发展前景。但在丛生竹的规模繁育方面, 常规的丛生竹繁育法成本高、效率低, 加之优良无性系种源稀少, 无法解决竹产业发展中的种苗大量需求问题。而通过组培选优, 可得到同母本遗传品性相同的优良子代, 且繁殖率极高, 成本相对较低, 上山造林较方便容易, 成活率也很高。利用植物组织培养技术开展竹子的试管繁育在国内已有

基金项目: 福建省林业厅林业科技项目(闽林科(2006)函3号)“优良耐寒丛生竹种选育及其组培快繁技术研究”

作者简介: 张玮, (1981-), 男, 浙江富阳人, 硕士, 研究员

*通讯作者: jzhxie@163.net

大量研究报道^[1-12]，但目前成年竹(生理年龄至少 25 年以上的竹子)组培成功的报道较少，花吊丝竹的组培快繁工厂化育苗研究未见报道。本文结合作者对花吊丝竹组培快繁工厂化育苗的研究与生产实践，对花吊丝竹组培快繁规模化育苗技术作一总结，为今后花吊丝竹及其他丛生竹的组培快繁工厂化育苗提供借鉴。

1. 材料与方法

1.1 材料

于 2007 年 3-11 月间，剪取花吊丝竹当年生未萌发节芽的主枝作为外植体引入试管，其中在 5 月份同时采集花吊丝竹的主枝、次生枝以及竹秆丛芽作为外植体引入试管，材料由福建省永安市大湖竹种园提供。

1.2 方法

1.2.1 材料的消毒和接种 采集的各种外植体，每种材料 50 个，先用 75%的酒精擦洗 2-3 次后置于冰箱中 10℃下保存 12-24 个小时，接种前将枝条切成 2-3cm 长的小段，每枝段带有一个节芽，并用 2‰的升汞溶液分三次各消毒 20、10、5 分钟，竹秆丛芽用 2‰的升汞溶液分三次各消毒 5、3、2 分钟，所有消毒均以吐温作为表面活性剂，每次升汞消毒后用无菌水清洗 6 次。消毒后，在超净工作台上将紧裹着节芽的叶箨剥去后接于试管中，芽朝着试管口并稍露出培养基外。竹秆丛芽每 2-3 个芽切为一丛。材料均接种于 3/4MS+BA4mg/L+KT1.0+cw100ml/L 的培养基中诱导丛芽，每瓶(200 mL 罐头瓶，下同)接种丛芽或节芽 1 个，培养 30 d 并统计竹苗污染率、成苗率和竹苗生长状况。

1.2.2 试管苗的继代培养与扩增 经过一个半月的培养，将生长较好的丛芽转入继代培养基，然后每隔 18-25 天进行继代增殖培养一次(褐化的无性系提前转移培养)，为了获得增殖倍数适中，芽生长良好的培养基配方，选取了 BA、KT 及 CW 在 3/4MS+BA4+KT1.0+CW100 的基础上进行了微调实验，激素配比见表 3，确定 BA、KT 的用量。单丛的接种均为 2-3 苗，每瓶接种 5 丛，每处理接种 50 丛，连续继代两次(50 天)后，统计平均增殖状况与生长情况。

1.2.3 针对成年竹继代过程中易产生褐化及叶片黄化的现象，采用不添加卡拉胶的液体培养基与固体培养基对照，进行花吊丝竹丛芽对比培养实验，培养基采用 3/4MS+BA2.0mg/L+KT1.0mg/L+CW100ml/L，每种处理 10 瓶 50 个丛芽，连续继代两次，每次培养时间 25 天后统计丛芽增殖倍数与生长状态。

1.2.4 试管苗生根培养 继代苗增殖到一定数量后，取分化状况良好的丛芽进行生根试验，利用正交原理设计实验，筛选最佳的生根培养基配方。以 1/3MS 为基本培养基，加入不同浓度的 IBA、NAA、KT 配比，每种处理 10 瓶，共 50 个丛芽，观察和统计丛芽生根率。

1.2.5 炼苗与移栽 当花吊丝竹丛芽根长 2-7cm 时，旋松培养瓶盖，放在自然散射光下炼苗 5-7 天即可。移栽前一天，将基质用 2.5‰的高锰酸钾溶液均匀消毒。移栽时，小苗根部先用稀薄高锰酸钾溶液浸泡 3-5 分钟，移栽后立即用 2.5‰的多菌灵溶液作定根水，喷洒至基质浸透，10 天后，每周给小苗叶面施肥，取稀释 500 倍的 MS 培养基中的大量元素母液作肥料。生根苗移栽采用两种基质：A、细河沙与泥炭土 3：1；B、珍珠岩与泥炭土 2：1 进行移栽。每类基质栽种生长情况相同的生根丛芽 50 个。45 天后统计成活率及竹苗生长状况。

1.3 培养条件

以 3/4MS 作基本培养基，附加不同浓度和种类的植物激素、蔗糖(继代 20g/L；生根 10 g/L)、有机添加物(肌醇 100mg/L、甘氨酸 2.0 mg/L、盐酸硫胺素 5.0 mg/L、盐酸吡哆醇 1.0 mg/L、烟酸 1.0 mg/L、椰乳 CW50~100 ml/L)、维生素 C 100 mg/L、卡拉胶(继代 4 g/L；生根 5g/L)、PH 值为 5.8-6.0，温度 25±4℃，辅助光照 14h·d⁻¹，光照强度为 1600-2000 lx。

1.4 数据处理

采用正交实验设计确定影响丛芽生根率的几个因素水平，因为生根率属于二项分布，故通过 $X'=\sin^{-1}X^{1/2}$ 进行数据转换，取得服从正态分布的 X' 进行显著性检验。

2. 结果与分析

2.1 花吊丝竹外植体最佳采集时间的选择

花吊丝竹不同季节采集的外植体诱导情况表明（见表 1）：3 月采集的外植体，由于枝条尚未完全木质化，因此在消毒过程中极易产生药害。5-6月采集的外植体无菌活体率在 50% 左右。7-11 月采集外植体引入试管的，2 周后平均有 52%产生污染，有 30%因药害死亡，剩下的茎段萌发了 2-5cm 长的 1 个芽，因茎段切口处易分泌出引起茎段褐化的物质，故 7 天左右要向新的培养基转移一次。三周后，未污染的茎段芽细小，越来越容易褐化，芽生长缓慢，且有的芽开始变黄。一个月后，有少数茎段产生了丛芽，其余无菌茎段逐渐枯死。说明 7-11 月花吊丝竹无污染活体数较难获得，丛芽诱导难，并且 7-10 月温度高、湿度大，外植体易带菌，且难以消除，易产生黄色絮状污染物，且有的要经多次继代后才表现出来，说明不适宜在这个时期进行材料采集。11 月~次年 2 月适合诱导的外植体基本没有。因此花吊丝竹外植体（枝条）采集的最佳时期为 5~6 月。

表 1 花吊丝竹不同季节外植体引入情况

引入时间	污染率%	死亡率%	无菌活体率%
3 月	12	56	32
5 月	16	28	56
6 月	38	18	44
7 月	56	30	14
9 月	50	28	22
11 月	52	34	14

2.2 花吊丝竹外植体最佳采集部位的选择

5 月份采集花吊丝竹的主枝、次生枝、竹秆丛芽作为外植体引入试管，实验结果表明(见表 2)：有枝箨包裹的主枝和次生枝无菌活体得率较高，适宜作为外植体，而竹秆上萌发的丛芽由于材料幼嫩，消毒时间长易产生药害，反之消毒不彻底、易带菌，因此不适合作为外植体；以枝条为外植体诱导丛芽，实质上是以诱导其节上芽点萌芽并产生丛芽为目的。一般竹枝基部节上的芽因未有竹箨包裹，在消毒时极易受药害而难于诱导成功，只有枝上第二~五个

节上有枝箨包裹的芽较易获得无菌材料，易进一步诱导产生丛芽。因此选取半木质化的枝条，并且箨叶紧裹的竹节较易消毒。

表 2 花吊丝竹不同类型外植体引入情况

外植体	污染率%	死亡率%	无菌活体率%
主枝竹节（竹箨包裹）	16	28	56
主枝竹节（无竹箨包裹）	20	68	12
次生枝竹节（竹箨包裹）	12	42	46
竹秆丛芽（3-7 公分长）	38	62	0

2.3 花吊丝竹外植体的增殖与培养基优化

成年竹（生理年龄>25a）由于细胞已成熟，要回复到幼态，相对较难，需要在高浓度的细胞分裂素下进行。降低培养基中大量元素的用量，提高细胞分裂素的浓度有利于丛芽形成^[10]。但从芽诱导出以后，需要逐渐降低激素的用量，否则会产生大量畸形苗及玻璃化苗。继代培养基微调结果发现（见表 3）高浓度 BA 易诱导出丛芽，但多数为细弱的小丛芽，且极易褐化，逐渐降低 BA 用量到 2mg/L 时，可得到生长良好的苗，KT 适量时，芽生长较绿，较高，加入 CW 也有改善芽生长的作用，而不加 CW 的丛芽生长较差，较易褐化。因此花吊丝竹继代培养的较适的培养基配方为：3/4MS+BA2.0mg/L+KT1.0mg/L+CW100ml/L。

此外，随着无性系繁殖代数的增多，增殖倍数往往会下降，丛芽生长会衰退。逐渐降低培养基中细胞分裂素的浓度，可使丛芽的生长状态有所改善。因此在实际操作中，应该根据丛芽的生长状态间或调高或调低培养基中的激素浓度，使丛芽增殖倍数与生长状态的平衡点。

表 3 花吊丝竹丛芽在不同培养基中的生长状态

培养基	丛芽增殖倍数 (继代 25 天)	丛芽生长状况
3/4MS+BA2.0+ KT1.0+CW50	1.24	在连续培养 25 天后基部有褐化，部分苗叶片黄化
3/4MS+BA2.0+ KT1.0+CW100	1.28	基部褐化和叶片黄化丛芽数略有减少
3/4MS+BA4.0+ KT0.5+CW100	1.30	增殖倍数略有增加，部分丛芽矮小，叶片黄化
3/4MS+ BA4.0+ KT1.0+CW100	1.52	丛芽大量增殖，部分丛芽出现玻璃化现象
3/4MS+ BA6.0+KT1.0+CW100	2.10	丛芽大量增殖，有较多畸形芽，丛芽基部褐化严重

培养基优化结果表明：在固体培养基中丛芽的增殖倍数为 1.34，其中 20%的丛芽叶片出现黄化现象，34%丛芽基部褐化；而采用液体培养基丛芽的增殖倍数为 1.50，丛芽健壮，只有 10%叶片黄化现象，基部轻微褐化现象明显减轻。这说明花吊丝竹丛芽在液体培养基中的增殖倍数与生长状态都要优于固体培养基。这样既可以保持一定的繁殖速度，丛芽又有比较

好的长势，而且可以持续保持无性系的繁殖能力。且液体培养基成本相对低廉，但需要采取一定的固定方式不要让丛芽倒伏在液体培养基中，否则丛芽的长势会受到很大影响。

2.4 花吊丝竹丛芽生根培养基筛选

当花吊丝竹丛芽增殖到 1000 个左右时，进行丛芽的生根实验，采取正交实验以决定各因素水平。

花吊丝竹生根结果显示（见表 4）：第一次生根的生根率均未超过 20%，4 因素中激素 NAA 的极差最大，且生根率与 NAA 用量在一定程度上成正比，但方差检验结果表明 NAA 各水平值对生根率影响差异不显著。添加椰乳反而降低丛芽的生根率，但添加 KT 对丛芽的生长及生根状况有一定的改善作用。实验观测到第一次长出根的丛芽往往都是新诱导出的长度小于 1cm 的丛芽，未有新芽长出的植株不会长根。将未生根的丛芽转入花吊丝竹继代培养基重新继代培养，待 10 天左右长出新的丛芽后，再转入二次生根培养基，采用两种生根培养基：A：1/3MS+IBA4+NAA4.5+KT0.15+cw50；B：1/3MS+IBA4+NAA5.5+KT0.15+cw50，每种处理 20 瓶 100 株苗。结果显示生根培养基 A 二次生根率达到 51%；生根培养基 B 二次生根率达到 67%。说明对于成年竹培养，采用二次生根法是比较适合的方法，但仍面临生根率偏低的难题。

表 4 花吊丝竹丛芽生根培养基配方、结果分析表

处理号	IBA(mg/L)	NAA(mg/L)	KT(mg/L)	CW (ml/L)	生根率(%)	数值转换 $X'=\sin^{-1}X^{1/2}$
1	4	2.5	0.05	30	10	18.43
2	4	3.5	0.1	50	10	18.43
3	4	4.5	0.15	70	18	25.10
4	5	2.5	0.1	70	4	11.54
5	5	3.5	0.15	30	14	21.97
6	5	4.5	0.05	50	18	25.10
7	6	2.5	0.15	50	14	21.97
8	6	3.5	0.05	70	4	11.54
9	6	4.5	0.1	30	18	25.10
T1	61.97	51.94	55.08	65.51		
T2	58.61	51.94	55.08	65.51		
T3	58.61	75.31	69.05	48.18		
X1	20.7	17.3	18.4	21.8		
X2	19.5	17.3	18.4	21.8		
X3	19.5	25.1	23.0	16.1		
极差	1.1	7.8	4.7	5.8		

注：X1、X2、X3 分别表示各水平的平均值。

为了改善生根效果，直接采用二次生根法对丛芽进行生根实验，即丛芽引入生根培养基 B（1/3MS+IBA4+NAA5.5+KT0.15+cw50） 5-7 天后，立即转入继代培养基，待 10 天左右选

择有 1-4mm 长新芽萌发的丛芽进行生根正交实验（见表 5）。每处理 6 瓶共 30 个丛芽。结果显示，对于成年花吊丝竹采用二次生根法对于丛芽生根率有一定程度的提高作用，生根率最高的一组达到了 80%。实验中影响生根率的 4 个因素作用由大到小依次为 KT>IBA>NAA>大量元素，经方差检验结果表明各因素对生根率影响均未达到显著水平，说明在今后的试验中还要对各因素水平加大实验的力度。

由表 5 的实验结果可得花吊丝竹第二次生根较适培养基配方为：1/5MS+IBA8 mg/L +NAA4.5 mg/L +KT0.1 mg/L。

表 5 花吊丝竹丛芽二次生根培养基配方、结果分析表

因素处理	大量元素	IBA(mg/L)	NAA(mg/L)	KT(mg/L)	生根率(%)	数值转换 $X'=\sin^{-1}X^{1/2}$
1	1/3MS	4	3.5	0.05	26.7%	31.09
2	1/3MS	6	4.5	0.1	26.7%	31.09
3	1/3MS	8	5.5	0.15	36.7%	37.27
4	1/4MS	4	4.5	0.15	20.0%	26.57
5	1/4MS	6	5.5	0.05	36.7%	37.27
6	1/4MS	8	3.5	0.1	80.0%	63.43
7	1/5MS	4	5.5	0.1	76.7%	61.12
8	1/5MS	6	3.5	0.15	20.0%	26.57
9	1/5MS	8	4.5	0.05	46.7%	43.09
T1	99.45	118.77	121.09	111.45		
T2	127.27	94.92	100.74	155.64		
T3	130.77	143.79	135.65	90.40		
X1	33.1	39.6	40.4	37.1		
X2	42.4	31.6	33.6	51.9		
X3	43.6	47.9	45.2	30.1		
极差	10.4	16.3	11.6	21.7		

注：X1 、X2 、X3 分别表示各水平的平均值。

2.5 花吊丝竹生根苗的移栽

将花吊丝竹在生根培养基培养 45-50 天后长出根的丛芽 100 个，生根苗轻轻洗去培养基后，植入移栽基质 A、B 中，每种基质移栽 50 株。移栽 45 天后，结果为：A 基质配比的移栽成活率 92%；B 基质移栽成活率极低，只有 20%。从所得结果可看出，竹苗在有河沙的基质上移栽成活率较高，且生长更绿、更高、更快，发笋数量更多，移栽时发现根系比其它基质上发达，说明细河沙与泥炭土 3：1 是相对较好的移栽基质。在 5-8 月份炼的苗，一周后小苗开始成活，二周后开始生长，三周后长出新叶，四周后有明显的高生长，同时开始发新芽，五周后长出 2-3 片新叶，新芽 1-3 个，这样的小苗可算做炼苗成活的小苗，第七~九周后小苗生长旺盛，这时应将小苗移入圃地，否则小苗生长减慢，逐渐变黄，营养不良。

3 小结与讨论

综上所述，通过对花吊丝竹组培快繁育苗技术的研究，有以下结论：

花吊丝竹丛芽诱导的成功与否与外植体的采集部位、采集时间等相关,外植体的较好的采集季节为 5-6 月,最佳部位为有枝箨包裹的半木质化枝条中上部节段。以 3/4MS+BA4mg/L+KT1.0+cw100ml/L 培养基进行诱导,经过多次继代可诱导出丛芽。花吊丝竹丛芽增殖阶段的相对较适宜培养基: 3/4MS+BA2.0mg/L+KT1.0mg/L+CW100ml/L,采用液体培养基可以有效解决培养中竹苗褐化以及叶片黄化的问题的。;生根阶段采用二次生根法,先对丛芽生根过程中进行同步化处理,并在第二次生根过程中采用 1/5MS+IBA8 mg/L+NAA4.5 mg/L+KT0.1 mg/L 培养基可获得相对较好的生根率;花吊丝竹组培苗通常在泥炭土与细河沙(1:3)为基质上移栽成活率较高。

本研究探索了花吊丝竹组培快繁技术,由于本实验外植体采自生理年龄大于 10 年的花吊丝竹,因此外植体的诱导、继代以及生根等环节都要比来自种胚的外植体更加困难,主要体现在生根困难方面,成年竹生根难主要是由于在生根过程中未生根的丛芽极易褐化死亡,这时需要不断观察丛芽的生长状态,及时将未生根丛芽转入继代培养基继续培养,待其有新芽长出再进行生根,但这也加大了工作的强度,不利于工厂化规模繁育。下一步还需要改善其在各个环节的生长状态,探索降低培养成本的培养方式,为今后工厂化育苗提供参考。此外诱导丛芽的过程实际上是成年竹幼化的一个过程,但随着继代次数的增多,丛芽会出现增值率下降,长势变差等老龄化的状况,因此摸索丛芽诱导后的最佳增殖代数也是今后工作的重点。

丛芽继代过程中基部易褐化,在继代转接过程中需要对褐化部分进行剥离,而采用液体培养基大大改善了这一现象,初期应用时效果很好,但由于丛芽没有适合的固定装置进行固定所以在继代多次后容易出现丛芽倒伏在液体培养基中影响增殖的情况,实际操作中采用固体培养基与液体培养基交替继代培养可以得到较为良好的效果。今后还需要开发简易的固定装置以改善液体培养的效果。

参考文献

- [1] 马艳梅,何远康,何琼英等. 麻竹愈伤组织的诱导培养. 华南农业大学学报, 1993,14(3):131 - 140
- [2] 阙国宁,诸葛强. 竹子愈伤组织培养与植株再生. 竹子研究汇刊, 1991,10(4):79 - 80
- [3] 谭宏超,王灵昭,尹芳等. 竹子组织培养技术初步研究. 林业科技通讯, 1998,5:26 - 27
- [4] 吴益民. 当前竹子的组织培养和植株再生研究. 竹子研究汇刊, 1999,18(1):32 - 37
- [5] 张光楚,陈富枢,王裕霞. 麻竹离体快速繁殖技术的研究. 竹子研究汇刊, 1993,12(4):7 - 15
- [6] 张光楚,王裕霞. 竹子试管苗开花的初步研究. 竹子研究汇刊, 2001,20(1):1 - 4
- [7] 何凤发,倪成,江小华等. 麻竹种苗工厂化生产的技术体系. 林业科学, 2006,42(4):122-125
- [8] 王光萍,丁雨龙. 几种观赏竹种组织培养研究. 竹子研究汇刊, 2002, 21(2):5-9
- [9] 王裕霞,张光楚. 麻竹实生苗无性系的组培繁殖及其生长. 广东林业科技, 2000, 16(3):1-5
- [10] 张光楚,王裕霞. 杂种撑麻 7 号竹的组织培养研究. 林业科学研究, 2003, 16(3):245-253
- [11] 张光楚,王裕霞,李兴伟等. 丛生竹的组培快繁技术. 竹子研究汇刊, 2004, 23(1):13-20
- [12] 王敬文,蒋晶. 竹子的离体培养研究. 林业科学研究, 1998,11(6):640-646

毛竹抗逆锌指蛋白基因 cDNA 克隆与序列分析

刘志伟¹, 张智俊^{1*}, 黄业伟¹, 杨丽¹

(1. 浙江省现代森林培育技术重点实验室 浙江临安 311300)

摘要: 根据水稻抗逆相关锌指蛋白基因的保守区序列设计引物, 以毛竹基因组 DNA 和 cDNA 为模板, 采用 PCR 方法, 成功扩增出 1 个含有完整阅读框架的 cDNA 序列, 长度为 495bp, 序列无内含子, 共编码 164 个氨基酸, 将其命名为 *PeZFP* 基因 (GenBank 登录号 FJ472953)。氨基酸序列 (GenBank 登录号 ACL01101) 的分析结果表明, *PeZFP* 与其他锌指结构蛋白有较高的同源性, 同水稻锌指结构抗逆蛋白 *OSIAP1* 序列相似性高达 87.7%, 且其序列 C 端具有典型的 AN1 类型的锌指结构 Cx2-4Cx9-12Cx2Cx4Cx2Hx5HxC, 在 N 端具有典型的 A20 类型锌指蛋白结构, 推测此 *PeZFP* 为植物抗逆 *OsIAP1* 类似基因, 在功能上与毛竹抗逆性相关。

关键词: 毛竹; 锌指蛋白; 克隆;

cDNA Cloning and Sequence Analysis of a Zinc-finger Protein Gene Involved in Stress-tolerance in *Phyllostachys edulis*

Liu Zhi-wei¹, Zhang Zhi-jun^{1*}, Huang Ye-wei¹ Yang Li¹,

(1. The Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300; China)

Abstract: A zinc-finger protein gene from *phyllostachys edulis*, named as *PeZFP* (GenBank accession number FJ472953), was cloned through PCR using primers designed according to the zinc-finger protein genes conserved region of other plant. The coding region of the genomic clone of *PeZFP* is continuous, without an intron. The cDNA of *PeZFP* contains an open reading frame of 495 bp and codes for a protein of 164 aa (GenBank accession number ACL01101). The database search using the amino acid sequence as query showed high homology to several zinc-finger proteins, especially the *PeZFP* sequence showed the maximum homology (87.7% identity) to *OSISAP1* (*Oryza sativa* subspecies *indica* stress-associated protein gene), and it has a typically conserved sequence Cx2-4Cx9-12Cx2Cx4Cx2Hx5HxC (X represents any amino acids) at the C-terminal AN1-type zinc finger and the N-terminal A20 type zinc-finger. Therefore we predicted that the *PeZFP* could be an important determinant of stress response in bamboo.

Key words: *phyllostachys edulis*; Zinc-finger protein; cloning

毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 属禾本科竹亚科刚竹属, 耐瘠薄, 较抗寒, 是我国竹类植物中分布范围最广、栽培面积最大、蓄积量最多、经济价值最高的一个材用和笋用竹种, 在我国林业生产中占有非常重要的地位。在植物的生长发育过程中, 非生物性胁迫 (如高盐, 高低温等环境胁迫) 下严重影响其正常的生理代谢, 酶、离子通道以及调渗蛋白等^[1]来调节自身代谢来适应环境的影响。锌指蛋白就是其中一个重要的家族。锌指 (Zinc finger, ZFs) 是识别核酸的一种普遍性蛋白结构元件, 它通过一对半胱氨酸和一对组氨酸与 Zn^{2+} 络合; 自我折

叠成一种手指状的蛋白结构。典型的锌指结构为C2H2型锌指，此外还发现有C2HC，C2C2，C2HCC2C2，C3HC，C2C2C2C2等结构，包含有该序列的蛋白质通常属于核转录因子家族^[2]。研究表明，锌指蛋白在逆境条件下，可通过与DNA、RNA结合或与DNA和RNA双向结合来促进或抑制转录，使植物对非生物胁迫作出响应。

现阶段在分子水平上对于毛竹抗逆性的相关研究还未见文献发表，本文以毛竹为材料，获得了1个与水稻抗逆锌指蛋白OSISAP1^[3]同源的锌指蛋白基因全长克隆，命名为*PeZFP* (GenBank登录号:FJ472953)，并对其序列进行了分析，以期在分子水平上开展竹子抗逆性的相关研究工作。

1 材料与方法

1.1 材料

以毛竹一年生实生苗为材料，经过瞬时干旱处理4h，取叶片5 g，采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法，提取并纯化基因组DNA；同时，选用北京鼎国的RNA快速提取试剂盒提取毛竹RNA。Marker，Taq plus DNA聚合酶，dNTPs均购自上海生工，感受态细胞DH5 α 为实验室自备，载体pMD18-T、逆转录试剂盒 (TaKaRa AMV Ver 3.0) 购自大连宝生物公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增

在比较植物锌指蛋白基因序列保守区的基础上，设计两对长度均为20bp的通用性引物，并递交上海生物工程技术有限公司合成，分别是上游引物P1:5' -AGCGCGACAAGAAGGATCAG，下游引物P2:5' -TAGTCGTAGCTGCAGCCGTG；嵌套引物上游引物NP1:5' -CCCGGCCACGCAGAACCTGT，下游引物NP2:5' -ACAGCTCGCCGCACCGGCAC。其中，嵌套引物为验证序列测序的准确性。提取的毛竹RNA经过逆转录合成毛竹cDNA序列，经过PCR克隆目的片段。反应体系 (25 μ L) 为10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L，MgCl₂ (25 μ M) 2.0 μ L，dNTP (10 μ M) 0.5 μ L，引物 (10 μ M) 0.5 μ L，Taq plus DNA聚合酶 (8.34 $\times 10^{-5}$ kat $\cdot$ L⁻¹) 0.3 μ L，模板DNA 2.0 μ L (100ng)，ddH₂O 16.7 μ L。反应程序为：94℃预变5min，94℃变性30s，55℃退火30s，72℃延伸30s，30个循环，4℃保温。嵌套引物采用相同的反应体系，退火温度为60℃。

1.2.3 目的片段的回收和重组

把PCR扩增产物经1%琼脂糖电泳检测后，利用QIAGEN公司的离心柱型琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒从琼脂糖凝胶上回收目的片段；纯化产物与pMD18-T载体16℃连接过夜，并转化感受态细胞DH5 α ，挑取白色单菌落，37℃摇菌过夜；以微量菌液为模板进行PCR验证是否为阳性克隆。

1.2.4 目的片段的测序及生物信息学分析

将含有目的片段的重组质粒寄上海生物工程技术有限公司进行测序。测定的序列用BLAST进行同源序列比对；蛋白的亲疏水性使用DNAMAN软件分析；分子进化树的构建使用软件MEGA4.1软件中NJ法完成。用ProtParam分析*PeZFP*编码蛋白的氨基酸序列组成、相对分子质量、

等电点等理化性质(<http://au.expasy.org/tool/protparams.html>); 利用PBIL LYON-GERLAND信息库对蛋白质序列进行二级结构预测(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html); 利用TMHMM软件进行蛋白质跨膜区预测(<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); 利用Signal P程序分析N末端信号肽序列(<http://genome.cbs.dtu.dk/services/signal/>); 利用ProtFun分析预测PeZFP蛋白的功能(<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>)。运用scratch protein对蛋白质的二硫键做出分析(<http://www.ics.uci.edu/baldig/scratch/index.html>); SWISS-MODEL在线进行PeZFP同源建模。

2. 结果与分析

2.1 *PeZFP* 基因克隆

以毛竹 cDNA 为模板, 通过设定的两对特异性引物进行 PCR 扩增, 得到长度为 500bp (图 1a) 左右的条带, 目的片段进行测序后获得长度为 495bp 的序列。由于目的片段测序结果与水稻同源基因 *OSISAP1* 在中间区域 (长度 100bp 左右) 差别较大, 设计一对嵌套引物来验证测序的准确性, 经 PCR 扩增出一条 300bp 左右的条带, 测序后确定该序列长度为 285bp (图 1b)。

另外, 为获悉 *PeZFP* 在基因组水平的结构, 当以毛竹基因组 DNA 为模板, 通过设定的一对对外显子特异性引物 P1/P2 进行 PCR 扩增发现, 所得目的片段的测序结果与以 cDNA 为模板克隆出的序列一致, 表明毛竹基因组中 *PeZFP* 编码区无内含子存在。

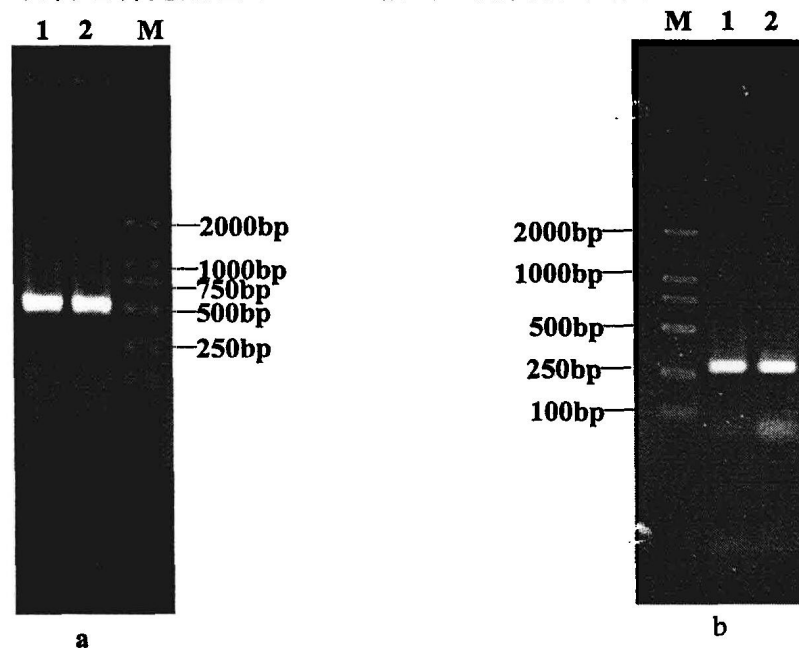


图 1 PCR 克隆结果 (1-2 :PCR 扩增产物; M:MARK)

a:M: DNA 分子量标记; 1: P1/P2 从 cDNA 中扩增出的 *PeZFP* 基因产物 2: P1/P2 从 DNA 中扩增的 *PeZFP* 基因产物

b:M: DNA 分子量标记; 1: NP1/NP2 从 cDNA 中扩增出的 *PeZFP* 基因产物 2: NP1/NP2 从 DNA 中扩增的 *PeZFP* 基因嵌套产物

Fig1. Isolation of *PeZFP* gene amplified with P1/P2 and NP1/NP2 from *Phyllostachys edulis*

2.2 生物信息学分析

2.2.1 毛竹PeZFP锌指结构类型

毛竹 *PeZFP* 基因长495bp，编码164个氨基酸，在16-50氨基酸位点之间含有锌指ZF-A20功能域，在102-145氨基酸位点间含有锌指ZF-AN1功能域。利用BLAST比对，显示其与以下几种锌指蛋白序列类似，包括粳稻锌指蛋白（AF140722）、籼稻锌指蛋白（A2Z2J6）、拟南芥锌指蛋白（Q9LHJ8）、玉米锌指蛋白（NP001100266）、人锌指蛋白PRE1、小鼠锌指蛋白（AWP1），鲑鱼锌指蛋白（NP-998204）等。在*PeZFP*蛋白序列的N端（见图2a），发现具有4个保守的半胱氨酸残基，这种结构与抑制细胞凋亡的锌指蛋白A20类似；在蛋白C端具有AN1类型的典型锌指结构域^[3]：Cx2-4Cx9-12Cx2Cx4Cx2Hx5HxC，x代表任意的氨基酸，其中保守的半胱氨酸和组氨酸残基可参与形成锌指结构（见图2b）。

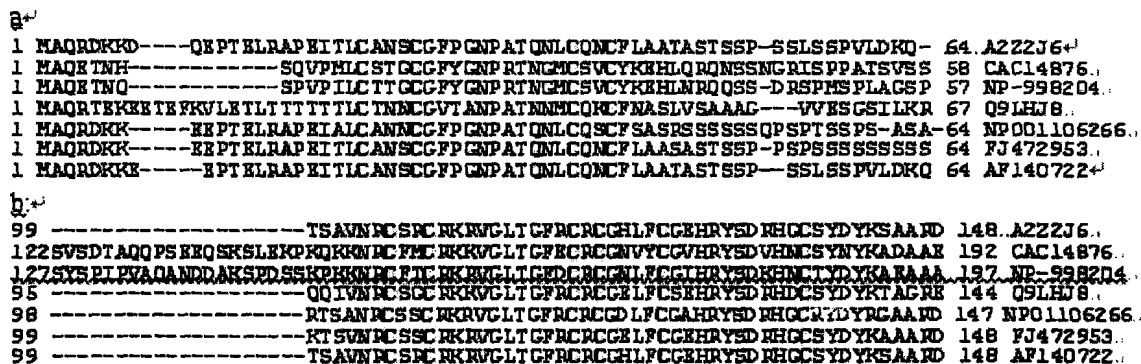


图2 *PeZFP*和其它植物AN1型锌指结构域的氨基酸序列比较

(a) N端的A20型锌指结构 (b) C端的AN1型锌指结构

Fig2. Comparison of deduced amino acid sequence from *PeZFP* and other Zinc-finger proteins. (a) A20 type zinc-finger at the N-terminal (b) AN1-type zinc-finger at the C-terminal

2.2.2 *PeZFP*锌指蛋白的结构特点和理化性质

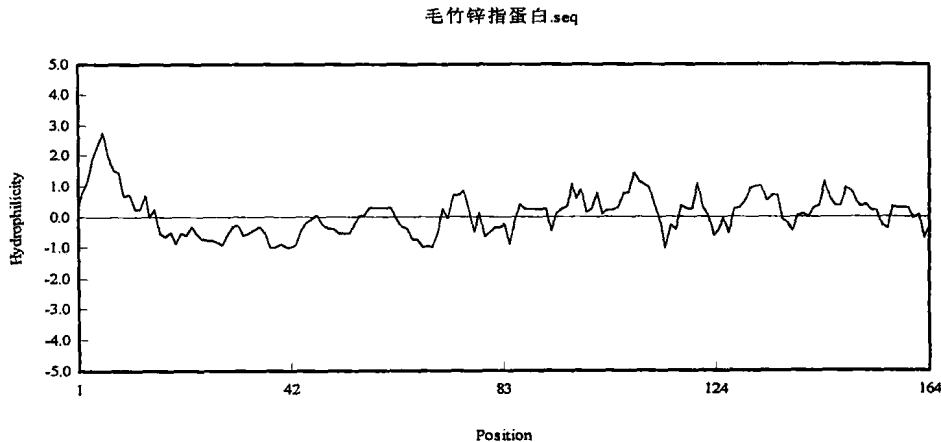


图3 *PeZFP*锌指蛋白氨基酸序列的亲水性分析

用Protparam预测PeZFP锌指蛋白的理化性质,推测该蛋白相对分子质量为17698.2,等电点为9.14;理论推导半衰期大于10h,不稳定参数为56.29,属于稳定蛋白(标准40以下为不稳定蛋白)。PeZFP的二级结构,在整个区域主要存在五个螺旋区(helix)和三个折叠区域(sheet),其余部位均为无规则卷曲(coil),分别占其二级结构的28.05%、7.32%、64.63%。二级结构中预计可形成二硫键四个,分别在第121-137、105-119、22-38、108-126,参与维持蛋白质构象的稳定。PeZFP疏水性/亲水性分析结果表明(图3),第42位亮氨酸(Leu)的疏水性最强,第6位赖氨酸(Lys)亲水性最强。总体来看,PeZFP属于亲水性蛋白,这与水稻OSIAP1等蛋白亲疏水性性质一致^[3]。

毛竹锌指蛋白PeZFP中有8个Ser,2个Tyr,这些位点可能成为蛋白激酶磷酸化的位点。另外,毛竹锌指蛋白PeZFP存在O型糖基化修饰位点有21处(12、20、25、34、46、49、50、51、53、54、56、57、87、91、99、100、106、115、132、138、143),但没有发现N型糖基化修饰位点。推测PeZFP经磷酸化和糖基化修饰后参与逆境胁迫条件下的细胞内信号传导。利用Signal P程序分析PeZFP锌指蛋白N末端序列,发现该蛋白没有跨膜区,也不存在信号肽剪切位点。但通过蛋白质亚细胞定位软件PSORT预测发现PeZFP,在N端和C段分别存在一个内质网膜定位信号的功能域:AQRD和KIVR。推测该蛋白合成后进入内质网完成诸如磷酸化等后续加工,然后以囊泡形式进行蛋白质运输参与胁迫调控。进一步通过ProtFun预测毛竹锌指蛋白PeZFP的主要功能,发现此蛋白有调节器官反应的功能以及调节信使核苷酸合成的作用。结合上述分析初步推断PeZFP与植物抗逆胁迫响应蛋白具有类似的功能。

2.3.3 毛竹锌指蛋白PeZFP的同源性比较和进化树

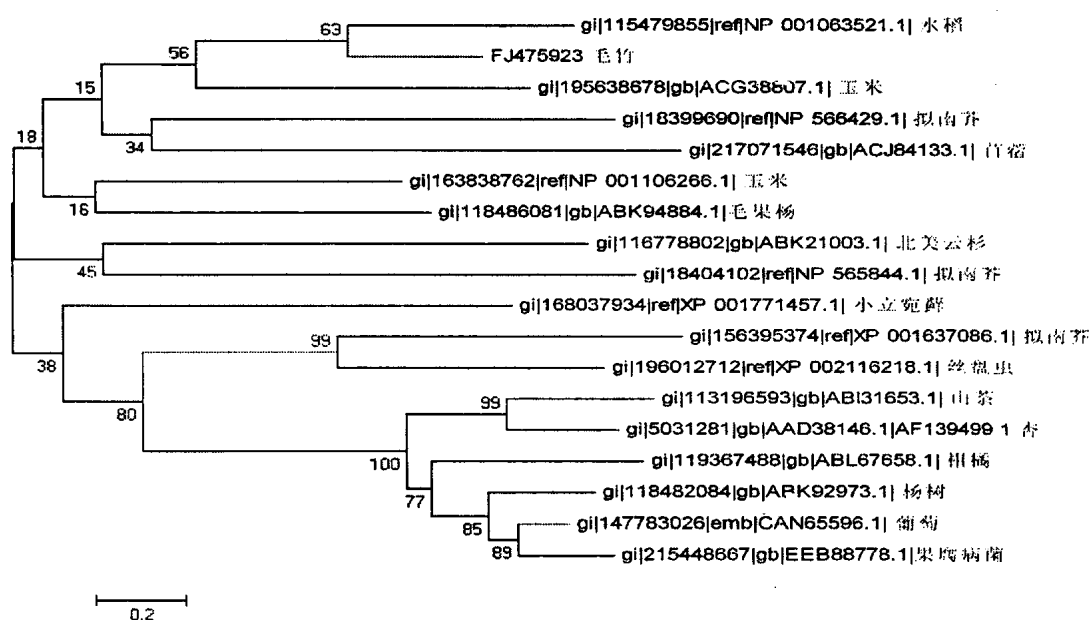


图4 毛竹 PeZFP 与其他已知逆境胁迫相关锌指蛋白的系统发生分析

Fig.4 Phylogenetic tree of PeZFP and other stress-responsive zinc-finger proteins

为了进一步分析PeZFP和其它植物抗逆锌指蛋白之间的进化亲缘关系,选取水稻,玉米等多个物种的锌指蛋白序列进行氨基酸同源性比较发现:毛竹PeZFP与其他植物锌指蛋白同源性在50.3%-87.7%之间,其中同源性最高的是水稻(*Oryza sativa japonica* Group),同源性高达87.7%。在此基础上构建的系统进化树(图4)结果表明,毛竹PeZFP锌指蛋白(ACL01101)与水稻的锌指蛋白(NP-001063521),属于同一类抗逆功能蛋白;其次与玉米胁迫响应锌指蛋白(ACG38807)、拟南芥AN1-like锌指蛋白、玉米AN15蛋白等都存在较近亲缘关系。而与果腐病菌锌指蛋白、葡萄锌指蛋白、毛果杨锌指蛋白、柑橘锌指蛋白亲缘关系较远。

2.3.4 毛竹锌指蛋白PeZFP三级结构同源建模

为分析PeZFP空间结构特点,通过SWISS-MODEL进行其三维结构同源建模,建模结果表明:本文克隆的毛竹锌指蛋白PeZFP中锌指结构域与已知晶体结构的拟南芥锌指蛋白结构类似(图5A)。其中AN1区有两个反向平行的 β 折叠(Strand)和一个 α 螺旋(Helix)。半胱氨酸和组氨酸残基氨基酸残基分别位于 β 折叠和 α 螺旋中,并通过氢键结合一个Zn原子,形成锌指结构。另外,在PeZFP的C端,也发现了一个类似A20型锌指结构(图5B),推测PeZFP可能通过上述两个锌指结构与染色体DNA结合,在转录水平上调控基因的表达。

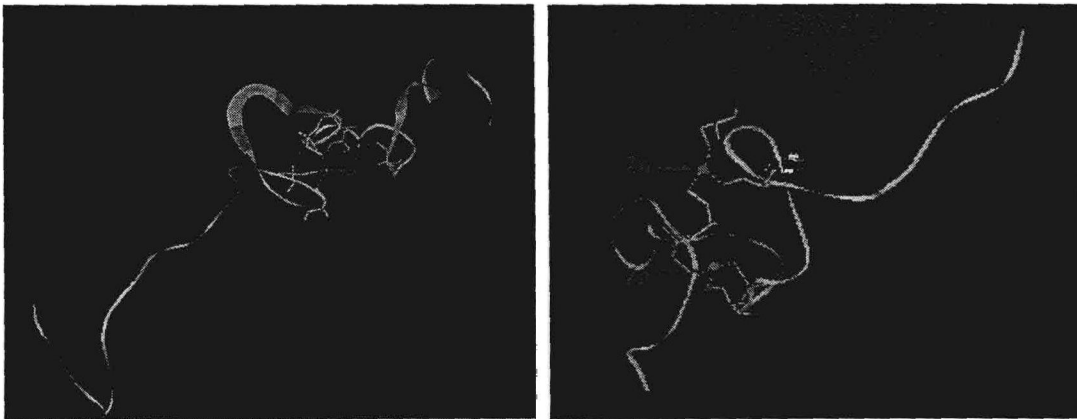


图5 PeZFP 锌指蛋白三维结构同源建模

A: 1wfl 中 AN1 型锌指结构. B: PeZFP 中 AN1 和 A20 锌指结构

Fig.5 Homology modeling of PeZFP protein using SWISS-MODEL

A. Structure of conserved AN1 domain of 1wfl; B. Structure of conserved AN1 and A20 domain of PeZFP

3 讨论

在生态环境的选择下,植物逐步形成了适应环境的不同反应机制,尤其是对逆境的反应机制。锌指蛋白作为抗逆反应机制中重要的一环,广泛的存在于生物体中。近年的研究证实,多种类型的锌指蛋白主要通过调控基因的转录来适应高温高盐等逆境,从而使植物在逆境条件下得以生存^[3, 6, 7]。

现阶段对于毛竹抗逆性的研究主要通过生理生化手段,而运用分子生物学手段对其进行